Dall'autore

Sulla struttura
del tessuto tendineo

A 248

SULLA STRUTTURA

DEL TESSUTO TENDINEO

OSSERVAZIONI

del prof.

GIULIO BIZZOZERO

IN PAVIA

(estratte dal Morgagni)

Nel 1866 io ho pubblicato in questo giornale il risultato dei miei studii sullo sviluppo dei tessuti di sostanza connettiva. — Riferendomi più particolarmente alla parte che riguarda il tessuto connettivo propriamente detto, io ho dimostrato come, nei suoi primordii, esso consti di cellule semoventi sparse in una sostanza gelatinosa ed amorfa; e come, più tardi, questa si trasformi in sostanza fibrillare, quelle perdano a poco a poco la loro contrattilità, ed abbandonando la forma sferoide, si tramutino in elementi fusati o stellati, provveduti di nucleo ovale. A questo modo si ha un connettivo più adulto e più compatto. — Eguali risultati ottenni studiando la cicatrizzazione dei tendini tagliati (1).

Ne' miei studii io aveva però sempre seguite le cellule connettive fino ad un certo stadio non molto inoltrato della loro vita; non le aveva accompagnate fino agli stadii ultimi, quali ci si presentano, p. es., nel tessuto compatto delle aponeurosi e dei tendini dell' animale adulto. Aveva riserbato questa parte a ricerche ulteriori, che sperava di intraprendere subito.— Senonchè altri lavori ed altre occupazioni me ne distolsero per molto tempo, e non mi permisero di cominciarle e di continuarle che nell' anno scorso; eccitato specialmente a ciò dalla introduzione nella scienza di alcuni nuovi metodi di preparazione, i quali mi permisero di sperare che dal mio lavoro avrei avuto maggior frutto dei miei predecessori.

Non credo utile di diffondermi qui nella esposizione delle numerosissime opinioni emesse dagli osservatori sulla struttura del tessuto tendineo; rimando per esse ai trattati ed ai lavori speciali. Fra gli italiani, ne diede un resoconto conciso e molto esatto il pro-

(1) Annali univers. di Medicina. 1868.

fessor ERCOLANI nel suo lavoro « *sulla struttura normale e sulle alterazioni patologiche del tessuto fibroso* » (1).

Non posso però ristarmi dall' accennare brevemente alle opinioni di VIRCHOW, di BEALE, di ERCOLANI e di RECKLINGHAUSEN, poichè di esse mi giovai più specialmente qual punto di partenza per le mie ricerche.

Secondo VIRCHOW (2), fra i fasci tendinei sono interposti degli elementi cellulari stellati, disposti a rete, e riccamente anastomizzati fra di loro, i quali, essendo limitati esternamente da una membrana, costituiscono una rete fittissima di canaliculi che trasportano il plasma nutritore fino nei punti del tessuto più lontani dai vasi. — Si avrebbe così la ripetizione di quanto si osserva nel tessuto osseo.

Secondo ERCOLANI (3) il tessuto fibroso, come il tessuto cartilagineo, è formato precipuamente da due elementi fondamentali: le *cellule*, che egli chiama « *fibrose* od *organo generatore*, che se sono disposte in serie longitudinali costituiscono delle vere fibre tendinose, e la *sostanza fibrosa* o *materiale elaborato* che è al di fuori di loro e le circonda completamente come avviene nelle cartilagini. » — Le fibre tendinose derivano dalle cellule arrotondate che costituivano il tendine giovine, e che più tardi si sono allungate e fuse ai loro capi in modo da costituire una fibra nucleata. La sostanza fibrosa o materiale elaborato non è che un prodotto delle cellule ed è costituita da un materiale compatto ed *omogeneo*. — Questa omogeneità della sostanza intercellulare dei tendini è sostenuta calorosamente dall' A., il quale non esita a dichiarare che l'apparenza fibrillare ammessavi da quasi tutti gli osservatori non è dovuta, come questi credono, all' esistenza di vere fibrille, ma sì ad artificio di preparazione.

Poco dissimili dalle idee di ERCOLANI sono quelle esposte da BEALE in varii suoi lavori, e specialmente nelle sue lezioni *sulla struttura dei tessuti semplici del corpo umano* (4) — Com' è no-

(1) Memorie dell' Accademia delle scienze di Bologna, 1866.

(2) Patologia cellulare. Ediz. franc. 1861, lez. 5.

(3) l. c. p. 12 e 34.

(4) On the structure of the simple tissues in the human body. London. 1861. p. 114 e seg. p. 185.

to, questo Autore distingue in ogni tessuto due componenti: la *materia viva o germinale e il materiale formato;* questo è il prodotto dell' attività di quella. — Ora, nel tessuto tendineo, i nuclei e le cellule degli autori non sono che materia germinale che appare sotto forma di masse ovali, che s' imbibiscono facilmente di carmino, e che spesso si congiungono l' una coll' altra ai loro capi. I numerosi prolungamenti e le numerose anastomosi laterali che molti ci hanno veduto, non sono nei tendini altro che il risultato meccanico della pressione che per avventura si è esercitata sul pezzetto di tessuto onde allestire il preparato. — La sostanza fibrosa degli autori corrisponde poi al materiale formato di Beale, ed ha origine da una trasformazione diretta della materia germinale. Egli acquista, perciò, tanto più il suo aspetto caratteristico, quanto più si allontana dalla materia germinale che lo ha prodotto ovvero quanto più remoto è il tempo della sua prima produzione.

Le opinioni di Recklinghausen sulla struttura del tessuto connettivo compatto, che differiscono di molto da quelle or ora esposte, sono fondate specialmente sui risultati da lui ottenuti collo studio del tessuto mediante un nuovo metodo: colla imbibizione di nitrato d' argento. Nella sua memoria pubblicata nel 1862 (1), egli descrive a questo modo la struttura del tendine: « trattando colla soluzione argentica delle sezioni longitudinali di tendine d' adulto (tendine d' Achille) si rendono palesi nell' interno del tendine, tra i fascetti, i canaliculi dei succhi (*Saftkanälchen*), che non poco si differenziano da quelli della cornea. Sono più scarsi, in rapporto alla sostanza fondamentale, e decorrono per buona parte paralleli all' asse longitudinale; esistono però anche palesi anastomosi trasversali, e le dilatazioni che si notano ai punti d' incontro giacciono a notevole distanza l' una dall' altra. A questo modo le maglie della rete sono molto allungate. — Anche qui le dilatazioni sono appiattite perpendicolarmente alla superficie, come si può riconoscere palesemente in quelle che stanno disposte obliquamente, ovvero si vedono del tutto da un lato. — Nei tendini di neonato o di animali giovani, all' opposto, i canaliculi sono molto più

(1) Die Lymphgefässe und ihre Beziehung zum Bindegewebe Berlin 1862.

corti, e le dilatazioni giacciono disposte longitudinalmente più vicine le une alle altre. Nei conigli giovani si avvicinano fino quasi a fondersi, cosicchè il tratto di comunicazione riesce cortissimo..... Io mi potei persuadere nei tendini di coniglio giovane che in questi spazii stanno delle cellule nucleate arrotondate, ben delimitate, isolabili. *Nei tendini più vecchi riscontrai nelle dilatazioni solo dei nuclei che, specialmente se veduti da lato, dimostravano forma di bastoncino* ».

Recklinghausen confermò anche più tardi queste sue idee nel suo capitolo sul *sistema linfatico* inserito nell' Istologia di Stricker (1). Secondo lui, gli interstizii fra i fasci di fibre e le lamelle connettive sono riempiuti di una sostanza uniente, omogenea, più solida, nella quale sono scavati i canaliculi dei succhi. Questi però non corrispondono alla rete canaliculare supposta da Virchow e da Leydig, perchè sono sprovvisti di membrana propria, e il loro lume è riempiuto in parte di cellule connettive fisse o semoventi, in parte di liquido.

Come da questo breve riassunto si scorge, si hanno le idee più disparate sulla struttura del tessuto in esame. Alcuni ammettono una rete di canaliculi costituita per intero da elementi cellulari; altri una rete indipendente di canaliculi che può contenere delle cellule; altri, infine, degli ammassi allungati di protoplasma, contenenti nuclei, e spesso riuniti longitudinalmente fra loro.

Per giungere al mio scopo io doveva adunque sciogliere due quesiti: 1.° Esistono realmente i canaliculi plasmatici o dei succhi, descritti da Recklinghausen? 2.° Qual' è il contenuto dei canaliculi, dato che essi esistano?

Le numerose obbiezioni che si sollevarono contro le scoperte di Recklinghausen, e che si trovano riassunte nei lavori di Harpeck, di Hartmann, di Schweigger-Seidel (2) etc. poggiano tutte sulla natura e sul modo d' agire del reagente da lui adoperato per le sue dimostrazioni. Secondo essi, le figure ottenute da R. non son dovute che a irregolari precipitazioni del nitrato d' ar-

(1) Handbuch der Lehre von den Geweben etc. herausgegeben von S. Stricker. 1869 p. 226, 227.

(2) *Leipz. Ber.* 1866.

gento, le quali, naturalmente, si modificano a seconda del tessuto che si esamina. L' azione dell' argento solitamente si limita agli strati più superficiali, e viene disturbata dalla presenza di un epitelio che impedisce l'entrata del liquido. Ora, secondo SCHWEIGGER-SEIDEL le figure dei canaliculi plasmatici che si ottengono dopo l' allontanamento dell' epitelio, sono dovute all' azione dell' argento su di uno strato sottoepiteliale ricco di albumina: hanno origine, cioè, alla superficie, non nell' interno degli strati connettivi.

Il nitrato d' argento ebbe, però, anche molti sostenitori ; sicchè io non avrei pensato ad intraprendere le mie osservazioni, se anche in lavori recenti non si fossero messi in dubbio i risultati ottenuti col metodo dì RECKLINGHAUSEN (1).

Io presi a soggetto di studio il tessuto tendineo , lasciando quindi da parte la cornea ed il centro tendineo del diaframma, in cui il tessuto non è più puro, ma, dovendo servire ad altri scopi, è più o meno provvisto di nervi e di vasi linfatici e sanguigni.

Volendo ottenere dei precipitati nell' interno del tessuto pensai di tentare il metodo che, introdotto da LEBER nella scienza, gli servì con tanto successo nello studio della cornea : la impregnazione coi sali di ferro (2).

Adoperai da principio i tendini digitali delle zampe posteriori della rana, i quali per la loro sottigliezza possono essere sottoposti interi alla osservazione microscopica. Il metodo da me trovato migliore, leggera modificazione di quello usato da LEBER per la cornea, è il seguente: Si leva con precauzione un tendine, lo si lascia per 15 minuti in una soluzione 1 p. 0[0 di solfato d' ossidulo di ferro; poi si spennella leggerissimamente, si asciuga su carta bibula, si immerge per un secondo in una soluzione 1 p. 0[0 di ferricianuro potassico, e finalmente si lava per 2 o 3 minuti nell'acqua, e si esamina in glicerina. Dapprincipio il preparato non è molto dimostrativo; più tardi, però, quando la glicerina è penetrata uniformente nel tessuto, il pezzo diventa più trasparente, sì

(1) V. tra gli altri il lavoro di SCHWEIGGER-SEIDEL. Leipz. Sitzungsbericht. 1870.

(2) V. Arch. Oftalm. di Gräfe. 1868.

che si possono scorgere con molta nettezza i limiti delle figure prodotte dall' impregnazione.

In un campo uniformemente colorato in azzurro spiccano delle figure incolori, di forma allungata, coll' asse maggiore parallelo all' asse maggiore del tendine, della lunghezza media di 70-100 μ. della larghezza di 9-11 μ. Questi spazii hanno gli orli laterali generalmente lisci; solo di rado inviano dei prolungamenti incolori alle figure vicine. Invece ai capi sono molto irregolari, come dentati; e il numero dei denti, generalmente puntuti, non varia solo nei diversi spazii (da 1 a 4-5) ma altresì nelle due estremità di uno stesso spazio. Nei preparati ben riesciti, poi, appare che questi denti corrispondono spesso a prolungamenti di diversa grossezza che mettono in comunicazione l' uno spazio coll'altro. I prolungamenti talora sono assai lunghi: il più spesso però sono brevi, perchè pur breve è il tratto che separa gli spazii tra di loro. Da ciò si può facilmente dedurre che nel tessuto tendineo questi spazii sono numerosissimi.

Gli spazii chiari corrispondono ai canaliculi plasmatici dimostrati da Recklinghausen col nitrato d' argento. É bensì vero che le figure che io ho ottenuto differiscono un po' da quella riportata a p. 53 del lavoro di Recklinghausen; p. es. in questa i punti d' incontro dei prolungamenti sono più corti e più arrotondati che nelle mie. Ma io credo che ciò debba attribuirsi alla differenza dell' animale preso in esame, essendomi io servito dei tendini della rana, egli di quelli dell' uomo.

Ottenni la dimostrazione di ciò in doppio modo: 1.° trattando collo stesso metodo dei sali di ferro delle sezioni di tendine di Achille di *uomo giovane;* ottenni delle figure che assomigliano assai a quelle della parte di mezzo della figura di Recklinghausen; quelle di *vecchio* sono molto più allungate; 2.° facendo a mia volta dei preparati col nitrato di argento. Pei tendini digitali delle rane usai del seguente metodo: si esportano con precauzione, si lasciano per 5-6 minuti in una soluzione di 1|500 di nitrato d' argento, vi si spennellano leggermente, poi vi si lasciano di nuovo per 2-3 minuti; infine si lavano nell' acqua comune, e, preparati in glicerina, si espongono al sole. — Pei grossi tendini di animali maggiori (coniglio, uomo), si spacca il tendine con rasoio ben af-

filato, seguendo col taglio la direzione dei fascetti, poi si bagnano le due superficie di sezione che ne risultano colla soluzione d' argento per sei o sette minuti; infine, dopo averlo lavato nell' acqua, si immerge il tessuto nell' alcool e si espone alla luce in modo che le superficie inargentate riescano fortemente illuminate. Il giorno dopo, a tessuto indurito, si fa col rasoio una sottile sezione superficiale della parte annerita e la si esamina in glicerina.

Le figure ottenute con questo processo corrispondono a quelle ottenute coi sali di ferro. Non c' è che questa leggiera differenza, che le figure argentiche hanno talora gli orli un po' meno regolari.

L' impiego dei sali di ferro ha poi varii vantaggi su quello dei sali d' argento. Infatti coi primi: 1.° il precipitato azzurro è più trasparente e permette di vedere anche strati sottoposti di tessuto; 2.° la penetrazione dei sali è più profonda, sicchè si ponno vedere diversi strati di canaliculi disposti gli uni sopra gli altri. A questo modo si combatte vittoriosamente l' obbiezione che i canaliculi non esistano realmente, ma siano solo precipitati irregolari *sulla superficie* del tessuto; 3.° rimane più visibile il contenuto dei canaliculi, sicchè anche con ingrandimenti non molto forti si possono scorgere i nuclei e parte dei granuli di protoplasma contenutivi.

Non contento della piena conferma ottenuta coi sali di ferro, diedi mano ad un altro reagente, pure in questi ultimi anni introdotto nella tecnica microscopica: *al cloruro d' oro*. Adoperai il metodo primitivamente proposto da Cohnheim (1) e leggermente modificato da Müller (2) nei suoi studii sulla cornea.

Il tendine freschissimo viene tenuto immerso per circa due ore in una soluzione 0,5 0[0 di cloruro d' oro, poi, lavatolo, si lascia per alcuni giorni alla luce solare (fino a che abbia acquistato un color rossobruno o violetto) mantenendolo immerso in acqua leggerissimamente acidulata con acido acetico.

L'azione del cloruro d'oro è diversa a seconda del tempo che du-

(1) Virch. Arch. Vol. 38 p. 343.
(2) Virch. Arch. Vol. 41. 1867.

rò la immersione nel sale del tessuto. Se il tempo fu breve, e quindi il colore acquistato dal tessuto non è molto intenso, i canaliculi sono quasi incolori, e la sostanza fondamentale è trasparente e di colore violetto chiaro. Nel caso opposto, quando il tessuto è di color carico, la sostanza interposta è trasparente e leggermente colorata in violetto, mentre i canaliculi sono opachi e di color bruno violetto per la precipitazione, nel loro lume, di granuli oscuri ed opachi. — Questo effetto si ottiene assai facilmente nel tendine di coniglio.

Ora, anche con questo metodo che per la certezza della sua riescita posso anch' io, come Kölliker (1), raccomandare a chi desidera farsi un' idea esatta della struttura del tessuto connettivo, si ottengono delle figure che assomigliano assaissimo a quelle ottenute cogli altri sali.

Senonchè anche con tutti questi controlli, era probabile mi si facesse la obbiezione che in tutti i casi io mi era giovato di precipitazioni di sali, ad onta che questi sali constassero di tre basi diverse, argento, ferro ed oro; e si tirassero in campo i vecchi argomenti già adoperati contro il metodo del nitrato d' argento. Qui davvero il compito degli oppositori sarebbe stato ben più difficile, avuto riguardo specialmente al cloruro d' oro, che in questi ultimi tempi venne riconosciuto come uno dei più preziosi reagenti onde mettere in evidenza gli elementi più delicati, p. es. degli epitelii e del sistema nervoso, e venne adoperato in un gran numero di ricerche.

Però, onde eliminare ogni minimo dubbio, io ricorsi ad un reagente posto in uso fino dai primi istologi; la cui azione, perciò, è conosciutissima nei più svariati gradi di diluzione; voglio dire, all' *acido acetico*. Io lo adoperai in soluzioni diluite assai; 1 goccia di acido glaciale per 40-60 grammi di acqua.

Onde seguire passo passo l' azione dell' acido sul tessuto era necessario di studiare l' azione del reagente, mantenendo sempre il preparato sul microscopio, e scegliendo delle parti, che per la

(1) Histologie, 1867 p. 180.

loro piccolezza e trasparenza non avessero avuto bisogno di essere preventivamente sezionate od alterate in un modo qualsiasi. Usai, perciò, ancora dei sottilissimi tendini digitali della rana, adoperando per liquidi di aggiunta primitiva una soluzione indifferente di cloruro sodico, che poi sostituiva con quella d' acido acetico aggiunta ad un lato del coproggetti ed assorbita dall' altro con pezzetti di carta bibula. A questo modo aveva una corrente liquida che agiva sul preparato, e che da principio andava sempre crescendo di acidità.

Il tendine, esaminato nel liquido indifferente, si presenta costituito da fasci paralleli di fibrille, distinguibili gli uni dagli altri per gli orli oscuri che li limitano. Gli elementi cellulari riescono appena visibili dopo una mezz' ora e più.

Nel principio dell' azione dell' acido acetico, invece, l' aspetto fibrillare della sostanza intercellulare diventa meno spiccato per l' impallidimento delle fibrille. Appaiono nuclei od ovali o più spesso allungati a bastoncino, a contorni netti, ma poco regolari, a contenuto finamente granulare, con uno o due nucleoli. Al dintorno dei nuclei, ad una certa distanza da essi, *spiccano assai i limiti dei canaliculi plasmatici*, il cui lume si differenzia dalla sostanza intercellulare per ciò che appare trasparente assai, non fibrillare, e presenta numerosi granuli pallidi, che stanno a preferenza accumulati lungo l' asse longitudinale del canaliculo; tra essi si notano talora alcuni granuli a orli più oscuri, dotati del potere di rifrazione dei granuli adiposi (Fig. 1ª). — La *forma di questi canaliculi corrisponde a quella delle figure ottenute coi sali*. — Solo i contorni appaiono spesso più regolari. Anche, in qualche rarissimo caso, il canaliculo appare molto dilatato; forse pel gonfiamento che l' acido acetico diluito esercita sul protoplasma che, come vedremo, è contenuto nel canaliculo stesso. Un' analoga azione si osserva, infatti, anche nelle cellule poco contrattili del connettivo lasso, come io ho già descritto nel mio lavoro sullo sviluppo del tessuto connettivo (1).

Progredendo l'azione dell' acido acetico, la sostanza fondamentale si fa quasi del tutto omogenea, scompaiono i limiti dei cana-

(1) Morgagni 1866. Fig. 4. *c c'*.

liculi, e non si scorgono che i nuclei, circondati ancora dai granuli di protoplasma.

Più tardi, infine, anche questi si rendono invisibili, e solo in una sostanza omogenea spiccano ancora i nuclei resi più sottili, più omogenei, più lucenti, senza traccia di granuli nè di nucleoli.

Azione simile a quella dell' acido acetico ha anche l'*acido solforico* diluitissimo.

I sali di argento, di ferro e d' oro, e gli acidi acetico e solforico in opportune soluzioni, s' accordano, quindi, nel dimostrarci nel tessuto connettivo tendineo una ricca rete di spazii anastomizzati fra loro.

Nella seconda parte del mio lavoro io mi era prefisso di studiare la natura del contenuto degli spazii esistenti nel connettivo compatto. — Abbiamo noi in essi solo un sistema di canali che trasportano i succhi, e che solo occasionalmente contengono cellule, oppure non sono essi la espressione di una corrispondente rete di corpi cellulari ?

Recklinghausen, come s' è veduto, si accosta alla prima opinione. Nei tendini di coniglio giovane potè vedere negli spazii delle cellule nucleate, arrotondate, ben delimitate, isolabili; nei tendini di animali più vecchi, invece, riscontrò nelle dilatazioni solo dei nuclei che, specialmente se veduti da lato, dimostravano forma di bastoncino. In entrambi i casi però la forma dei canali è indipendente da quella delle cellule, ed essi contengono, oltre a queste, anche una buona quantità di liquido che riempie quella parte di lume che vien lasciata libera tra la superficie delle cellule e i limiti del canaliculo.

Riesce assai facile constatare, *per quanto spetta alla forma dei nuclei*, la esattezza delle osservazioni di Recklinghausen. Tanto coll' acido acetico diluito, quanto colla imbibizione carminica e contemporanea impregnazione coi sali di ferro si ponno dimostrare, nel mezzo o verso le estremità degli spazii, dei nuclei molto allungati, la cui forma verrà descritta più tardi. — La costanza con

cui si presentano questi nuclei palesemente appartenenti a cellule fisse basta già da sola a dimostrarci come essi sieno componenti normali del tessuto, e come le cellule amiboidi, contro l'opinione di Recklingausen, non sieno, nel tessuto adulto, che elementi secondarii ed eccezionali.

Il pernio della questione sta però nella quantità e nella forma del protoplasma. È questo così scarso (come vuole Recklinghausen) da essere indifferente sulla forma dello spazio, ovvero questo si modella su quello ?

La decisione non poteva essere data che dal confronto della forma degli elementi cellulari che in un modo o nell' altro si potevano isolare mediante la dilacerazione del tessuto, colle figure dei canaliculi ottenute per mezzo dei reagenti.

Un lavoro di questa natura era già stato fatto da Langhans, poco tempo dopo la pubblicazione della memoria di Recklinghausen (1). Questo osservatore aveva usato del liquido di Muller per l' isolazione delle cellule, ed aveva confrontato poi queste alle figure ottenute col nitrato di argento. I suoi risultati però non riuscirono consonanti con quelli di Recklinghausen.

Secondo Langhans le cellule connettive « rimangono fusiformi anche dopo il parto, e a poco a poco diventano più piccole, senza mandare prolungamenti nè fibrillari, nè nastriformi..... Il nucleo non giace nel mezzo della cellula, ma il più delle volte ad una estremità di essa. È ovale alla periferia del tendine ; nella guaina tendinea, rotondeggiante ; contiene 1-3 nucleoli, e mostra spesso negli embrioni ed anche in animali giovani una forma di biscotto, dovuta ad infossamenti mediani, la quale indica che è in via di scissione (2) » — « Che le cellule si anastomizzino fra loro per mezzo dei loro prolungamenti longitudinali, non mi sembra verosimile; piuttosto io potrei sostenere il contrario. Nei preparati cogli acidi acetico, pirolegnoso e nitrico, in cui si scorgono le cellule *in situ*, si può persuadersi che la più parte di esse giacciono completamente isolate e non contraggono alcuna unione colle vicine, quando

(1) Langhans. Beiträge zur Histologie des Sehnengewebes in norm. und path. Zustande. (Würzb. naturwiss. Zeitschr. Vol. 5. p. 86. (864).

(2) l. c. p. 100.

non si lasci illudere da qualche fibra elastica. Il più delle volte giacciono le cellule, in numero di 4-8 e più, in fila l' una dietro l' altra, in modo da dare nella stessa direzione i loro lunghi prolungamenti, sicchè l' estremità nucleata di una cellula s' incontra col lungo prolungamento della vicina (1) »

Quanto agli spazii di Recklinghausen, ecco come Langhans si esprime : « Da' miei esperimenti sulla infiammazione dei tendini si ricava, che la vecchia opinione sullo scambio nutritivo della sostanza dei tendini è vera, e che essi, infatti, sotto questo rapporto hanno uno dei posti più bassi. Per ciò io non ritengo probabile che in essi si trovino questi spazii colossali che Recklinghausen ci disegna (2)». « Io ho fatto con questo metodo (del nitrato di argento) molte osservazioni, che in generale confermarono i risultati che io aveva già ottenuto, o almeno non li contradissero. I tendini di embrione e di animali giovani ed adulti vennero immersi ben freschi in una soluzione argentica del 2 1[2 per 100 o meno e tenutivi per un certo tempo (da 3[4 d' ora a varii giorni), fino a che divennero di colore bruniccio, bruno oscuro o nero. In ogni caso l' azione era, più o meno, superficiale. Il tessuto ordinariamente era abbrunato, e mostrava su sezioni longitudinali dei tratti fusiformi e trasparenti, con contenuto leggermente granuloso, che qua e là conteneva precipitati oscuri..... Io non ho veduto quelle figure che Recklinghausen disegna nella sua memoria sui vasi linfatici (3) ».

Riassumendo, secondo Langhans, gli elementi cellulari del tendine sono costituiti da cellule *fusiformi. assai piccole*, come appare anche dalle figure annesse al suo lavoro, che egli potè isolare specialmente col liquido di Müller, e che potè dimostrare anche colle imbibizioni argentiche. Queste imbibizioni, poi, lo condussero a negare la esistenza dei canaliculi plasmatici, per quanto riguarda la forma e l' ampiezza in essi riscontrate da Recklinghausen.

Come s' è veduto, le mie ricerche coi sali d' argento (con un

(1) l c. p. 102.
(2) l. c. p. 104.
(3) l. c. p. 99.

metodo che per la poca durata dell' immersione e per la diluzione delle soluzioni adoperate credo migliore di quello di LANGHANS), confermate con altri reagenti di azione più sicura, mi condussero a risultati ben diversi di quelli di LANGHANS, per quanto spetta agli spazii tendinei. — Ora, come si vedrà, anche l' isolazione degli elementi contenutici mi dimostrò delle cellule di forma diversa da quella da LANGHANS descritta.

Infatti io ci trovai delle *grandi cellule appiattite, che nella forma e nella grandezza corrispondono alle figure ottenute colle impregnazioni e coll' acido acetico.*

Cominciai le mie ricerche collo stesso reagente adoperato da LANGHANS, col liquido di MULLER; nè so spiegarmi la diversità dei nostri risultati se non dandone colpa alla diversa durata dell' immersione, e principalmente alla poca potenza degli obbiettivi da lui adoperati, che non gli permisero di vedere in tutta la sua estensione quel sottilissimo e trasparente strato di protoplasma che costituisce il corpo della cellula.

Io prolungai la immersione nel liquido di MULLER per 2-3 mesi, ed esaminai poi gli elementi dilacerando i pezzetti di tendine pazientemente al microscopio semplice, colorandone i nuclei quasi istantaneamente con una soluzione neutra concentrata di carmino ed adoperando forti obbiettivi ad immersione (di Hartnack (n. X) e di Amici).

La fig. 2ª rappresenta le cellule del tendine d' Achille di un *vitello*, tenuto immerso per 2 mesi nel liquido di MULLER e preparato in una miscela a parti eguali di glicerina ed acqua. — Il pezzetto di tendine che le fornì *venne tolto del profondo del tessuto*, onde prevenire ogni confusione colle cellule appiattite ed epitelioidi che ricoprono la superficie del tendine.

All' atto della dilacerazione le fibre tendinee si separano con discreta facilità, ed appaiono piuttosto grosse, paragonate, p. es. a quelle del coniglio.

Le cellule si riscontrano discretamente numerose. Contengono un nucleo a contorno molto spiccato, di forma ovale più o meno allungata, ed *appiattito*; sicchè mentre visto di fronte appare largo, visto da lato appare più sottile, quasi a bastoncino. La lunghezza media è 12-16 μ, la larghezza 4,8-6 μ, la grossezza 3-4 μ.

In questi preparati il nucleolo non si scorge, perchè vien ricoperto da granuli di diversa grossezza che precipitano nell' interno del nucleo, e che si raggruppano specialmente verso la sua parte mediana.

Il protoplasma cellulare è, comparativamente ad animali adulti, a granuli grossi e discretamente resistente (queste qualità devono far preferire i tendini del vitello a quelli di altri animali quando si voglia ottenere una facile dimostrazione delle cellule). — Il corpo delle cellule poi è ancora più irregolare, per la sproporzione dei diametri, di quello del nucleo. Infatti, quando sieno viste di fronte appajono come grandi elementi, assai lunghi e larghi, e trasparentissimi, sicchè facilmente, con obbiettivi deboli, si confondono col colore del campo del microscopio, in modo da scomparire, il nucleo eccettuato, alla vista (fig. 2 *a c*. Fig. 4.ª *b*.). Non hanno forma determinata, ma ne presentano di svariatissime; di solito però, ad onta della irregolarità dei contorni, sono allungate nella stessa direzione del nucleo, sicchè, mentre hanno una larghezza di 6-10 μ., hanno una lunghezza di 40-50 μ. Spesso sono ancora più grandi; ne vidi alcune che misuravano in larghezza 12 μ., in lunghezza 72 μ.. Se invece si esaminano gli elementi di profilo (fig· 2ª *d*. fig. 4ª *a*), si scorge che il protoplasma, che sembrava così abbondante, non forma che uno strato sottilissimo ; il corpo della cellula, visto il coltello, appare quindi sotto forma di una lunga linea irregolare, che in un punto vario del suo decorso passa sul corpo del nucleo (che, benchè pure appiattito, è però sempre due o tre volte più grosso del protoplasma), e che appunto per questo tratto acquista un colore più oscuro per la minore grossezza degli strati sottoposti.

Abbiamo quindi delle vere piastre cellulari nucleate, simili a quelle che Schweigger-Seidel riescì ad isolare nella cornea (1), ed alle cellule degli endotelii.

La loro sottigliezza, poi, ci dà ragione della frequenza colla quale si trovano delle cellule variamente ripiegate, e oltracciò della facilità con cui i sottili prolungamenti da esse si staccano. — Infatti questa io credo sia la causa per la quale di solito le cellule non

(1) Leipz. Sitzsber, 1870.

presentano prolungamenti, o ne presentano solo dei larghi. Il protoplasma, disposto com' è, in uno strato così sottile, si disaggrega in seguito ai più leggieri insulti meccanici; nel tendine fresco col processo grossolano della dilacerazione non si isolano che i nuclei; tutto il protoplasma è scomparso. — È questo un fatto che si osserva spesso nelle cellule delicate, p. es., nelle cellule nervose del cervello, nelle cellule di molti sarcomi. — Dopo alcuni giorni di immersione nel liquido di MULLER, i nuclei si isolano già circondati da un po' di protoplasma; la cui quantità cresce più tardi, quanto più ne aumenta la consistenza. Ciò però non continua indefinitamente, poichè dopo alcuni mesi aumenta la difficoltà con cui le fibrille connettive si lasciano staccare l' una dall' altra, e a questo modo riesce più difficile od impossibile l' isolazione delle cellule. Onde ottenere, adunque, degli elementi forniti di prolungamenti che corrispondano a quelli rappresentati nelle figure delle impregnazioni, è necessario esaminare tratto tratto i pezzi sottoposti all' azione del liquido di MULLER, e cogliere il punto favorevole. Il quale varia specialmente a seconda della stagione e della qualità e dell' età dell'animale.

Il nucleo risiede ora verso il mezzo delle cellule, ora *verso una estremità*. Quest' ultimo fatto qualche volta ha una origine artificiale, in quanto che nell' atto della dilacerazione si è distaccata quella parte di protoplasma che stava all' altro polo del nucleo. Più spesso però è naturale, e si può scorgere anche in cellule ancora racchiuse tra le fibre di sottilissimi fasci tendinei, isolati casualmente durante la preparazione. In questo caso assai spesso si osserva, che in due cellule poste l' una dietro l' altra, i due nuclei si trovano precisamente alle due estremità che si corrispondono, sicchè poi, se gli elementi riescono isolati, e la linea di confine tra l' uno e l'altro non è spiccata, può succedere che a tutta prima si creda di avere sott' occhio un elemento solo con due nuclei, e, conseguentemente alle teorie attuali, in scissione. Se questa spiegazione possa applicarsi a tutti gli elementi binucleati che si riscontrano nelle preparazioni, io non oserei davvero affermare.

Non è difficile che una scissione delle cellule tendinee, forse in misura molto limitata, abbia luogo anche nella vita intrauterina. Almeno me lo farebbe supporre quanto si osserva nei tendini di-

gitali della rana trattati coll' acido acetico secondo il metodo dianzi esposto.

S'è veduto che con questo reagente appaiono spiccati i canalicuili, ed in questi, i nuclei circondati da granuli di protoplasma. Ora, non di rado in spazii che corrispondono ad una cellula si contengono due nuclei, separati l' uno dall' altro da poco protoplasma; oppure da protoplasma e da un tramezzo posto di solito obliquamente (fig. 5.ª *a*). Di frequente poi occorre di vedere due cellule, che alle estremità opposte terminano perdendosi in filamenti sottili, mentre alle estremità che vicendevolmente si guardano, terminano arrotondate (fig. 5ª *b*.).

Trovo necessario attirare l'attenzione su questi fatti, anche perchè autorevoli osservatori, p. es. Beale, che hanno studiato gli elementi isolati, e con metodi poco variati, da questa differenza di forma dei due poli delle cellule vollero dedurre la prova del traslocamento, che, secondo la loro opinione, avrebbe luogo nelle cellule e avrebbe per risultato la produzione di fibre connettive; il polo arrotondato sarebbe l' anteriore, l' acuminato il posteriore, il quale colla sua punta darebbe origine alla fibra connettiva; e questa crescerebbe sempre di lunghezza pel movimento delle cellule. — Ora, come si può ciò ammettere, sapendo che quasi costantemente le due estremità arrotondate di due cellule vicine sono disposte l' una di contro all' altra, e perciò gli elementi cellulari non hanno la strada libera per progredire ?

Estendendo le mie indagini col liquido di Müller sui tendini di altri animali, mi fu dato di isolare cellule pure appiattite e grandissime nella rana (1), nei ratti grigi e bianchi, nella vacca, nel coniglio (fig. 4ª) e nell' uomo.

(1) Nelle cellule tendinee di rana isolate ebbi queste misure:

Nucleo. . .	lungo	30-35 μ
	largo	7-8 μ.
	grosso	4-5 μ.
Cellula	larghe	10-12 μ.
	lunghe	90-100 μ.

Si confrontino queste ultime due misure con quelle delle figure date dai sali di ferro. Del resto gli elementi sono di dimensioni troppo svariate per poter utilmente esser ridotti ad una media.

Come è già noto, nei neonati e negli animali molto giovani le cellule tendinee sono rotonde, ovali, o solo leggermente allungate. Più tardi vanno continuamente diventando più piatte ed anche più lunghe. Di lunghissime ne isolai nei tendini di un *vecchio* di 67 anni: ne trascrivo la relazione quale trovasi nel mio libro di note: Tendine d' Achille e legamento rotulo-tibiale da due mesi nel liquido di Müller. — Il legamento è meno duro del tendine, entrambi però si dilacerano con facilità e lasciano a nudo gli elementi cellulari che, come di solito, sono generalmente disposti in fila l' uno dietro l' altro. I nuclei di questi variano assai in dimensioni e forma: alcuni sono ovali; altri invece già allungati a bastoncino, sicchè p. es. su di una larghezza di 3 μ misurano una lunghezza di 33 μ; in altri, finalmente, ad eguale larghezza, la lunghezza è ancora molto maggiore. Sono a contorni spiccati, e contengono solo alcuni grossi granuli disposti a preferenza lungo il loro asse longitudinale. — Il protoplasma spesso si stacca per la dilacerazione. È finamente granuloso, e di frequente contiene anche, sparsi qua e là, granuli più grossi (adiposi?). Quando è ben conservato, lo si vede disposto ai poli del nucleo, lasciandone liberi, o quasi, i contorni laterali; e vi si dispone in tanta quantità che ne risultano elementi sottili e lunghissimi. La cellula disegnata nella figura 3ª *b'* aveva queste enormi proporzioni; larghezza del nucleo 2,5 μ, lunghezza 51 μ; larghezza della cellula 3 μ, lunghezza 168 μ!

Nella rana e nell'uomo ho isolato le cellule tendinee anche coll' *acido osmico*, in soluzione acquosa all' 1 0[0, (1).

Già dopo quattro giorni d' immersione il tendine di rana si lacera facilmente cogli aghi, e si scioglie in fasci di fibrille di colore biancobruniccio, a contorni spiccati ed a decorso piuttosto rigido. Le grandi cellule tendinee si isolano facilmente. Il nucleo ha contorno netto e liscio e contiene una sostanza che solo con forti ingrandimenti appare finamente granulosa; questo fatto permette di constatare la presenza di uno o due nucleoli; ciò che non

(1) Probabilmente la soluzione era un po' più diluita, perchè già conservata da alcuni mesi nel Laboratorio.

si può facilmente ottenere nei preparati del liquido di MULLER. Il protoplasma cellulare si rompe con molta facilità; è costituito di granuli pallidi, piuttosto grossi, tra cui si notano qua e là granuli più spiccati, rifrangenti come gli adiposi. — Dopo un mese di immersione i nuclei si isolano ancora bene; ma il protoplasma se ne distacca e si disaggrega con troppa facilità.

Nell' uomo l' acido osmico serve bene per la dimostrazione dei nuclei e nucleoli; assai poco per quella del protoplasma cellulare.

Finalmente anche il *cloruro d' oro* (metodo più sopra esposto, immersione prolungata nell' acqua acidulata , dilacerazione) mi servì per isolare le cellule tendinee della rana. I nuclei riescono incolori, il protoplasma invece appare di color quasi nero. C' è qui pure lo svantaggio che questo si separa facilmente da quelli; ma, ad onta di ciò, i preparati che se ne ottengono giovano assai perchè le cellule, pel loro colore oscuro, possono venir dimostrate anche con ingrandimenti relativamente piccoli ; a differenza di quelle preparate col liquido di MÜLLER, che per la loro somma trasparenza, ne richiedono sempre di assai forti. — La forma della cellula, nei due casi, è eguale.

Una nuova prova della precisione con cui i sali d' argento e di ferro si precitano nella sostanza tendinea e ne lasciano incolore le cavità che contengono le cellule, si ha nello studio dei tendini digitali di rana, là ove, come da tempo è noto (ROLLET) essi contengono cellule cartilaginee disposte in file longitudinali, presentanti degli stadii di passaggio alle vere cellule tendinee (fig. 6.ª)

Le cellule cartilaginee, a protoplasma più consistente, ed a contorni spiccati, possono venir dimostrate con tutta facilità coi soliti reagenti sia dentro nel tessuto, sia fuori, isolate. — Ora, colla impregnazione si può constatare che le figure incolori che ne risultano corrispondono perfettamente alla forma che viene da tutti riconosciuta nelle cellule cartilaginee.

Oltracciò, coi sali e coll'acido acetico diluito si possono ottenere

preparati eleganti delle forme di transizione tra cellule cartilaginee e cellule tendinee; dimostrare, cioè, come le prime, che pur sono rotonde o leggermente poligone, trapassino nelle seconde allungando il loro nucleo e mandando prolungamenti, che, mentre rendono irregolare la forma della cellula, diventano sempre più lunghi, sottili e ramificati e vanno a fondersi qua e là coi prolungamenti delle cellule vicine (V. la fig.).

La rete più elegante e più fitta di cellule connettive che io abbia riscontrato nel corso delle mie indagini è quella che sta in una fascia che, appena al di sotto della pelle, ricopre la regione lombare della rana, e che con somma facilità si può staccare dagli strati muscolari sottoposti. Questa fascia si prolunga anche sul dorso, ma qui l' aderenza è maggiore, sicchè si presta men bene alla osservazione.

In questa fascia le impregnazioni riescono assai belle, e, benchè fatte con diversi sali, si assomigliano tra loro meravigliosamente; per questo riguardo io trovo questa fascia di molto preferibile al tendine. Oltre di che, il tessuto già naturalmente è disposto in istrato così sottile che può senz' altro venir sottoposto all' esame microscopico.

Per tener disteso il tessuto durante l' azione dei sali d' argento e di ferro è utile lasciar la fascia aderente, come si trova nello stato normale, ai tessuti dell' animale, e solo metterla allo scoperto levando colla forbice la cute sovrapposta. — Per l' impregnazione argentica si immerge un pennello nella soluzione del sale, e lo si ripassa leggermente a più riprese sulla fascia; dopo 5-7 m. questa diventa bianca; allora la si lava con acqua di fonte, la si esporta cautamente dall' animale colla forbice, si lava di nuovo nell' acqua, ed in glicerina si espone alla luce. Di solito rimangono aderenti dei lembi di endotelio che si staccano col pennello. — Per l' impregnazione ferrica si passa il pennello immerso previamente nella soluzione di solfato di ossidulo per alcuni minuti sulla fascia, poi si asciuga questa leggermente con carta bibula, si bagna rapidamente colla soluzione di ferricianuro; e alfine, quando è

diventata azzurra, si lava, si stacca, si lava di nuovo e si esamina in glicerina.

Lo strato più superficiale, quello che è a contatto colla pelle, è ricoperto da un completo endotelio. Sotto invece stanno varii strati di fibre connettive; i fasci di uno stesso strato sono paralleli fra loro, ma incrociano ad angolo più o meno acuto i fasci degli strati sotto-e sovra-posti. I nuclei generalmente hanno il loro asse più lungo parallelo alle fibre dei fasci.

Ora, in questi strati col nitrato d' argento, col cloruro d' oro, coi sali di ferro e coll' acido acetico diluito si ponno dimostrare, le une sovrapposte alle altre, delle magnifiche reti di spazii, copiosamente anastomizzati fra loro, e contenenti grandi nuclei ovali circondati da numerosi granuli di protoplasma (fig. 7ª).

In questa fascia col liquido di Müller solo di rado potei isolare degli elementi cellulari corrispondenti all' ampiezza dei canaliculi. Li isolai però con minore difficoltà, ovvero potei scorgere il loro protoplasma riempiente il canaliculo, nei preparati coloriti col cloruro d' oro, — Anche talora mi riescì a vederli spiccati nell' interno del tessuto, irritando variamente con mezzi chimici e meccanici la fascia, e lasciando progredire per due o tre giorni la infiammazione. A questo tempo i nuclei della fascia potevansi scorgere circondati da un compatto ammasso di granuli che riempiva esattamente gli spazii anastomizzati.

Negli strati più profondi della fascia si osservano qua e là sparse delle grandi cellule pimmentate, che mandano numerosi prolungamenti partenti di solito a guisa di raggi dal centro rappresentato dal nucleo e da un po' di protoplasma. Ora col trattamento coi sali di ferro e d' argento si scorge, che la forma di queste cellule è simile a quella delle cellule dimostrate dai sali; che gli ammassi di pimmento sono limitati della sostanza fondamentale artificialmente colorata; e, infine, che i prolungamenti delle cellule che contengono visibilmente pimmento vanno a congiungersi coi prolungamenti di altre cellule simili che non contengono pimmento, ma che vengono dimostrate dall' azione dei sali.

Anche in questa fascia, adunque, come nei tendini, svariati metodi di preparazione dimostrano l' esistenza della ricca rete di spazii già descritta, in diverse specie di tessuto connettivo, da Re-

CKLINGHAUSEN. Questi spazii non sono limitati, come riteneva VIRCHOW, da una membrana, perchè la dilacerazione più accurata, che riesce ad isolare gli elementi contenutivi, non la dimostra. Essi hanno una forma molta appiattita, e contengono sempre delle cellule, che o per la forma o per la grandezza si scostano dalla descrizione che ne diedero ERCOLANI e BEALE.

Infatti le cellule tendinee, adattandosi alla forma degli spazii, sono pure larghe assai, appiattite, simili a quelle degli endotelii, oltracciò contengono un nucleo ovale od a bastoncino. Rassomiglierebbero, per certi riguardi, a quelle già descritte da KÖLLIKER (*Gewebelehre* 1867 p. 162).

La differenza principale poi, che corre tra i risultati miei e quelli ottenuti da RECKLINGHAUSEN sta in ciò che, mentre egli crede che negli spazii possano essere nello stato normale tanto le cellule fisse quanto le amiboidi, io ci trovai *sempre* cellule fisse a nucleo ovale od allungato. E ciò è di qualche importanza; infatti, secondo RECKLINGHAUSEN, i canaliculi sarebbero per così dire indipendenti dalle cellule; mentre, secondo me, non sarebbero altro che lo spazio occupato dalle cellule; senza che sia necessario ammettere un intervallo tra la superficie esterna del protoplasma cellulare e la parete dello spazio che lo contiene.

Dicendo che gli spazii sono occupati da cellule *fisse*, non voglio implicitamente conchiudere che alle volte non ci si possano trovare cellule *semoventi*, le quali colla loro contrattilità possono penetrare in canali di molto più sottili di quelli scavati nel connettivo per le cellule fisse; e queste hanno protoplasma così delicato, che facilmente può venir spostato dall' avanzarsi delle cellule semoventi. Infiammando la fascia lombare, non di rado ho veduto delle cellule amiboidi a ridosso del nucleo delle cellule fisse. Qui però non siamo di fronte ad un fatto o frequente o fisiologico, ma ad un fatto o raro o patologico.

La maggior parte dei risultati da me ottenuti nello studio del connettivo compatto, e qui sopra esposti, venne in succinto comu-

nicata al *R. Istituto lombardo delle scienze* nelle sedute del 19 agosto 1869, e 24. febbraio 1870 e pubblicata nei Rendiconti.

Durante il corso delle mie indagini venne pubblicato un lavoro di Ranvier (1) nel quale questo autore descrive gli elementi cellulari del tendine simili a cellule endoteliche postë in fila, e accartocciate su se stesse in modo da formare un cilindro cavo, che dovrebbe servire al trasporto dei succhi. — Io non ho potuto in alcun modo confermare le osservazioni di Ranvier.

Più tardi vide la luce una nota del dottor P. Guterbock (2); da essa appare come l' Autore, impiegando il cloruro d' oro, sia giunto a risultati molto simili ai miei. — Ad onta della indipendenza delle nostre ricerche, debbo però far osservare che la mia *Nota* che espone l' azione del cloruro d' oro sul tessuto tendineo venne letta nella seduta del *R. Istituto* del 19 agosto 1869, mentre quella di Guterbock porta la data del dicembre 1869 e venne pubblicata nel *Centralblatt* del 15 gennaio 1870.

(1) Arch. de Physiologie Vol. II. p. 471.

(2) Centralblatt. n.° 3. 1870.

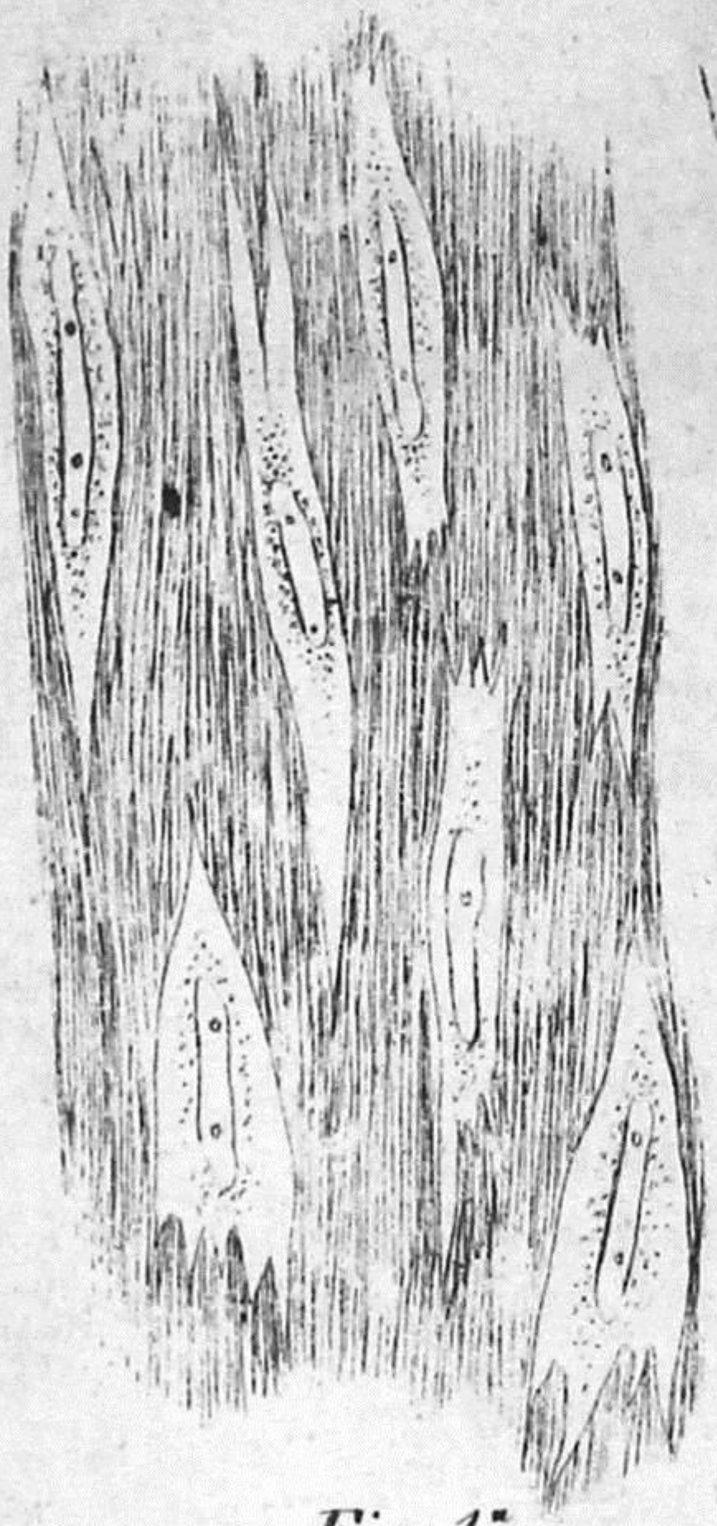


Fig: 1.ª

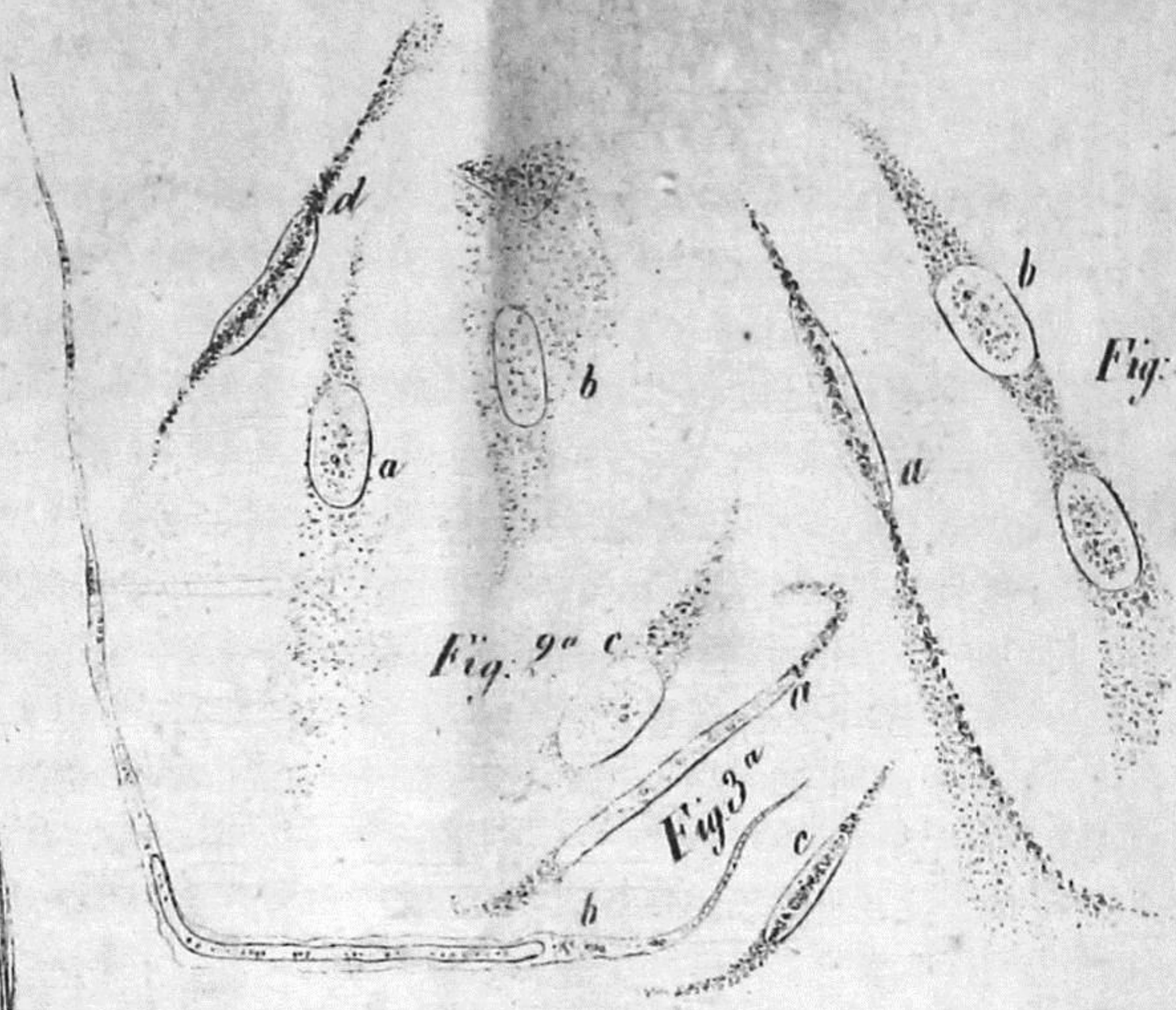


Fig: 5.ª

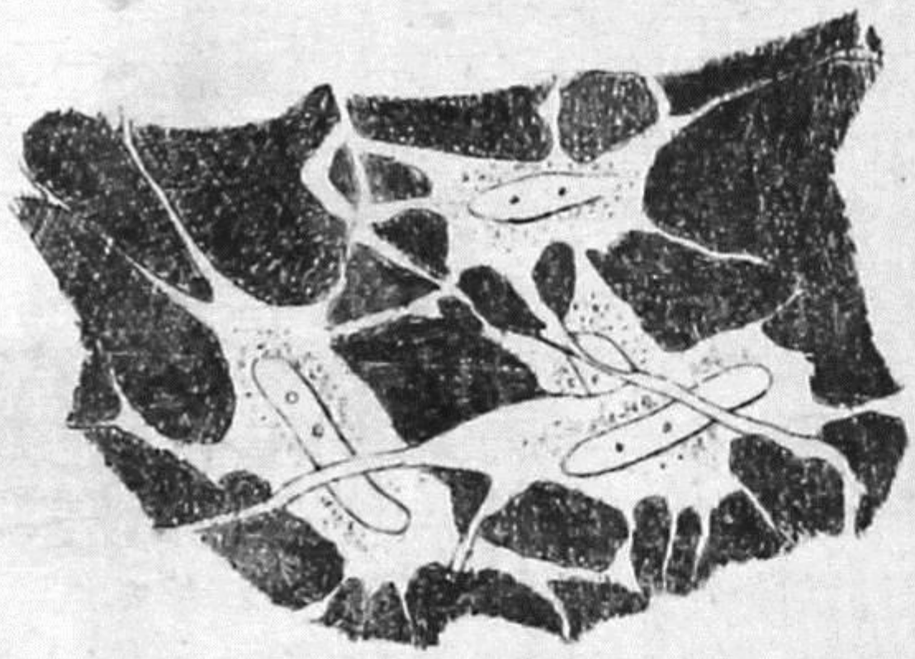
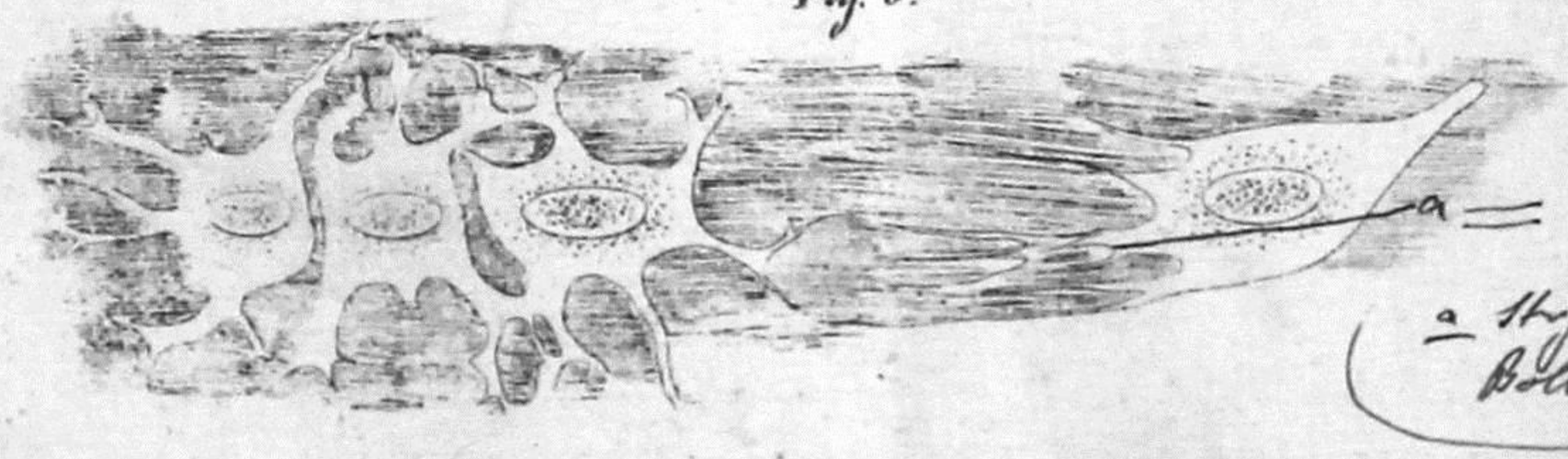
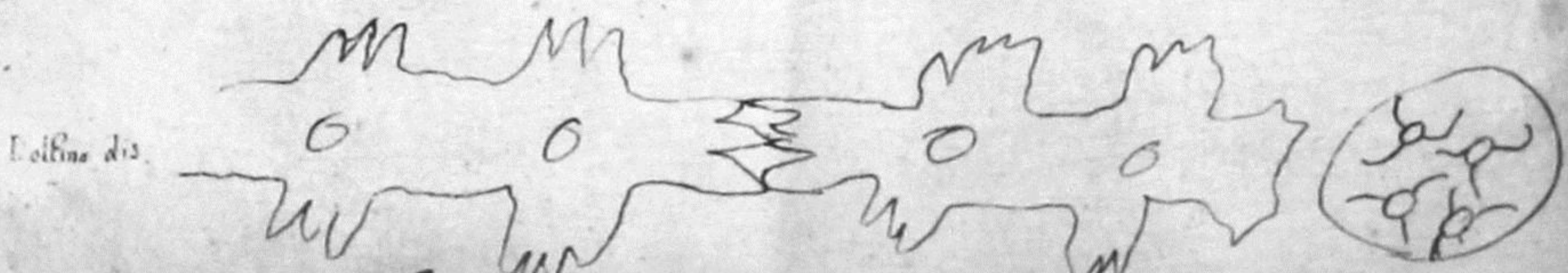


Fig: 7.ª

Fig: 6.ª



a Thisse elastica di Bell.



Tellina dis.

Cellule tendine muscolari di Stefanini

SPIEGAZIONE DELLE FIGURE

(Microscopio di Hartnack)

Fig. 1.ª Tendine digitale di rana trattato con acido acetico diluitissimo. In una sostanza fondamentale a fibrille longitudinali spiccano gli spazii contenenti i nuclei ed alcuni granuli appartenenti alle cellule tendinee. (Oc. 3. Obb. VIII)

Fig. 2.ª Cellule tendinee di vitello isolate col liquido di Müller. *a*, *c* vedute di fronte. *b* cellula veduta di fronte, ripiegata in alto, e con un prolungamento a destra. *d* cellula veduta di profilo. Solo nella parte superiore parte della cellula è disposta obliquamente (Oc. 3. Obb. X immers.)

Fig. 3.ª Cellule tendinee di un vecchio. *a*, *c* cellule che hanno perduto parte del loro protoplasma. *b* cellula a protoplasma meglio conservato, contenente qua e là granuli splendenti. (Oc. 3. Obb. X immers.)

Fig. 4.ª Cellule tendinee di coniglio. *a* veduta di profilo. *b*. di fronte. (Oc. 3. Obb. X immers.)

Fig. 5.ª Tendine di rana con leggerissimo acido acetico: due cellule che s' incontrano, e sono divise l' una dall' altra da un tramezzo obliquo: cellule che terminano arrotondate. — Per comodità non vennero disegnate che le parti delle cellule che si corrispondono (Oc. 3. Obb. X immers.)

Fig. 6.ª Punti di transizione dalle cellule cartilaginee alle connettive. Tendine digitale di rana. In *a* le cellule differiscono dalle vicine cellule cartilaginee solo per pochi prolungamenti inviati in direzioni diverse. In *b* sono molto più simili alle connettive (Oc. 3. Obb. VIII)

Fig. 7.ª Fascia lombare di rana trattata coi sali di ferro. In un fondo omogeneo azzurro (qui disegnato bruno) spiccano le cavità che contengono le cellule connettive. Di queste si scorge solo il nucleo circondato da pochi granuli (Oc. 3. Obb. VIII).